

УДК 577.115,582.28

## ВЛИЯНИЕ УЛЬТРАЗВУКОВОЙ ОБРАБОТКИ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА ВЫХОД И СОСТАВ ЖИРНЫХ КИСЛОТ ПРОДУКТА БИОКОНВЕРСИИ

© 2022 г. В. А. Чхенкели<sup>1</sup>, С. С. Шашкина<sup>2</sup>, \*, Т. Н. Малова<sup>3</sup>, С. Н. Евстафьев<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО Иркутский государственный университет, Иркутск, 664003 Россия

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО Иркутский национальный исследовательский технический университет, Иркутск, 664074 Россия

<sup>3</sup>ФГБУ Иркутская межрегиональная ветеринарная лаборатория, Иркутск, 664005 Россия

\*e-mail: chiffa19@mail.ru

Поступила в редакцию 10.10.2021 г.

После доработки 12.11.2021 г.

Принята к публикации 17.11.2021 г.

Подобраны условия предварительной обработки ультразвуком жидкой питательной среды при подготовке посевного материала для культивирования гриба рода *Trametes*. Установлено, что воздействие УЗ с частотой 40 кГц в течение 5 мин оказывает значительное влияние на качественный и количественный состав жирных кислот (ЖК) в продукте биоконверсии лигноцеллюлозного субстрата грибом рода *Trametes*. Обнаружено увеличение содержания ПНЖК в составе жировой фракции в продукте биоконверсии, что свидетельствует о его большей питательной ценности.

**Ключевые слова:** жирные кислоты, базидиомицет, ксилотроф, ультразвуковая обработка, опилки, твердофазное культивирование

**DOI:** 10.56304/S0234275822010033

Одним из актуальных направлений в биотехнологии является разработка способов получения ценных продуктов с использованием грибов и микроорганизмов. Большое внимание сегодня привлекают базидиальные грибы. С одной стороны, они могут использоваться в качестве пищевых продуктов, с другой – базидиомицеты применяются в качестве природных источников биологически активных веществ, сырья для производства белковых кормовых добавок [1, 2]. Особый интерес представляет группа базидиальных грибов-ксилотрофов. Наличие внеклеточного комплекса лигнолитических ферментов позволяет им эффективно разрушать разнообразные лигноцеллюлозные субстраты. Благодаря этим свойствам ксилотрофы нашли широкое применение в области переработки таких отходов как опилки, солома и пр. [3–5].

Перспективным объектом исследований среди базидиомицетов-ксилотрофов является гриб *Trametes pubescens* (Shumach.: Fr.) Pilat штамм 0663. Существует ряд исследований, которые свидетельствуют о возможности его использования в ряде биотехнологических процессов. Так, например, в работе [6] приводится химический состав мицелия гриба, полученного при культивировании

на оптимизированной глюкозо-пептонной среде. Высокие показатели перевариваемости и биологической ценности белка, а также состав липидной фракции, содержание микро-, макроэлементов и витаминов позволяют сравнивать полученный мицелий по питательной ценности с грибами, традиционно употребляемыми в пищу. На основе *T. pubescens* были разработаны антибактериальные ветеринарные препараты Леван-2, Траметин [7]. Кроме того, мультиферментный комплекс гриба позволяет эффективно утилизировать промышленные отходы, как химических производств, так и деревоперерабатывающей промышленности [8, 9].

Конечный продукт биоконверсии лигноцеллюлозного субстрата грибом представляет собой белково-углеводный комплекс, который может использоваться в качестве кормовой добавки после определения питательной ценности и токсикологических исследований [10]. Для оценки возможности его применения необходимо проведение ряда исследований. Одним из этапов является определение качественного и количественного состава компонентов, а также их соотношение в продукте. Питательную ценность комплекса оценивают по содержанию его основных компонентов: углеводов, белка, жирных кислот, витаминов, микро- и макроэлементов

*Список сокращений:* ЖК – жирные кислоты; МКЦ – микрокристаллическая целлюлоза; ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты; УЗ – ультразвук.

**Таблица 1.** Состав жидкой питательной среды [7]  
**Table 1.** Composition of nutrient medium

Компонент	Масса, г/л
Калий фосфорнокислый однозамещенный	3.01
Калий хлористый	1.5
Магний сернокислый	1.5
Сахароза	64
МКЦ (микрористаллическая целлюлоза)	20
Пептон мясной ферментативный	20
pH	6.0 ± 0.2

Варьированием условий культивирования, состава питательных сред и методов подготовки сырья и продуцентов удается не только повысить скорость и увеличить объемы вырабатываемых продуктов, но и добиться направленного биосинтеза целевых соединений. Все приемы предварительной подготовки можно разделить на химические, физические, физико-химические и биологические [11]. В связи с тем, что манипуляции с сырьем для биоконверсии в промышленных масштабах могут быть экономически нецелесообразны, рациональнее подвергать обработке питательные среды, используемые при культивировании посевного материала для основного этапа ферментации. Одним из возможных методов является применение ультразвука. Воздействие акустических волн способствует протеканию гетерогенных реакций, инициирует образование радикалов и приводит к частичной или полной деполимеризации входящих в состав объекта соединений [12].

Цель настоящей работы – изучение влияния ультразвуковой обработки среды для посевного материала на биосинтез жирных кислот и их состав в продукте биоконверсии опилок грибом рода *Trametes*.

## УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Объектом исследования являлся базидиальный гриб-ксилотроф *Trametes pubescens* (Shumach.:Fr.) Pilat штамм 0663 из коллекции грибов лаборатории биохимии Ботанического института им. В.Л. Комарова РАН (г. Санкт-Петербург). Систематическое положение продуцента: царство *Fungi*, отдел *Basidiomycota*, подотдел *Agaricomycotina*, класс *Agaricomycetes*, порядок *Polyporales*, семейство *Polyporaceae*.

### Условия культивирования

Продуцент поддерживали на среде Сабуро (ООО “Биотехновация”, Россия). Глубинное культивирование гриба для получения посевного материала в течение 5 сут осуществляли на питательной среде, которую предварительно подвергали

ультразвуковой обработке (40 кГц) на установке Codyson PS-10A Ultrasonic cleaner (Jeken, КНР). Состав питательной среды приведен в табл. 1. Культивирование осуществляли в качалочных колбах объемом 750 мл, при  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  и постоянном перемешивании (120 rpm). Определение выхода биомассы проводили методом высушивания [13].

Твердофазное культивирование осуществляли при  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  в течение 45 сут на опилках сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris*, L.) крупностью 1–5 мм, влажностью 65% без перемешивания. В качестве посевного материала использовали мицелий гриба штамма *T. pubescens*, выращенный в условиях глубинного культивирования. Посевной материал составлял 10% от массы субстрата.

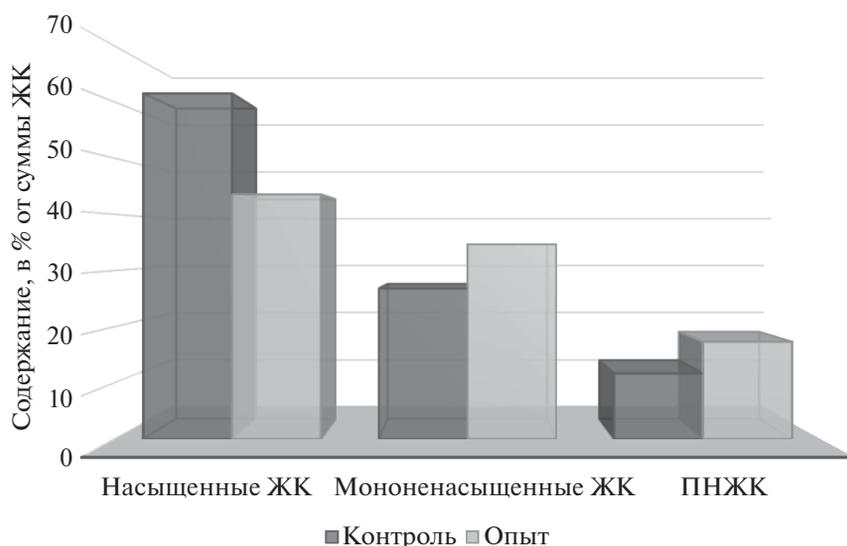
### Определение состава жирных кислот

Жировую фракцию из пробы субстрата после твердофазного культивирования экстрагировали гексаном (гидромодуль 1 : 2). Для получения метиловых эфиров экстракт обрабатывали раствором метилата натрия. Анализ состава метиловых эфиров жирных кислот осуществляли по методике [14] на хроматографе GC 2010 PLUS (Shimadzu, Япония) с пламенно-ионизационным детектором с кварцевой капиллярной колонкой Supelco – 2560 длиной 100 м и внутренним диаметром 0.25 мм. Газ-носитель: гелий, скорость потока газа 33 см<sup>3</sup>/мин. Условия анализа: подъем температуры с 150 до 200°C – со скоростью 10°C/мин, выдержка 10 мин при температуре 200°C.

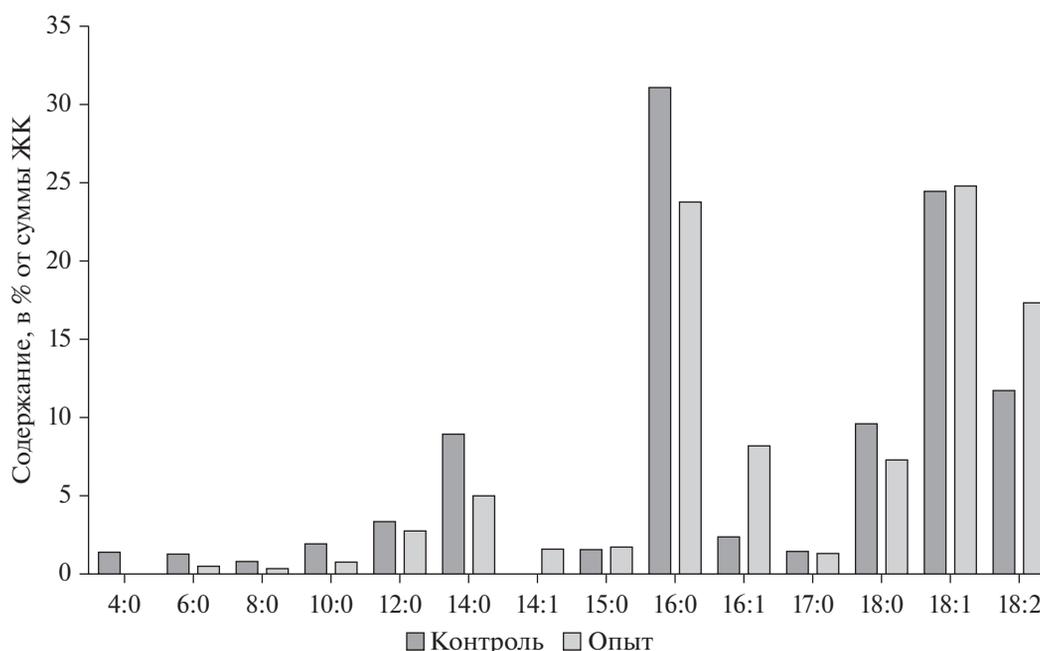
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенного исследования установлено, что предварительная обработка УЗ жидкой питательной среды в течение 5 мин способствует повышению выхода биомассы продуцента с 0.48 г/мл (контрольный опыт) до 0.56 г/мл. При последующем увеличении продолжительности воздействия УЗ это свойство практически полностью утрачивается, возможно, вследствие того, что углеводы, находящиеся в растворе, подвергаются химическим превращениям с образованием кислот, формальдегида, оксиметилфурфурола и других продуктов [15, 16].

В составе жировой фракции продуктов, полученных путем биоконверсии опилок грибом, идентифицировали 14 соединений, включая 10 насыщенных и 4 ненасыщенные ЖК. В образце без предварительной обработки среды (контроль) содержание насыщенных ЖК составляет 61.5% от общего содержания жирных кислот (рис. 1). В опытном образце напротив, преобладают ненасыщенные кислоты, а на долю насыщенных ЖК приходится менее 45%.



**Рис. 1.** Содержание основных компонентов жировой фракции.  
**Fig. 1.** The content of the main components of the fat fraction.



**Рис. 2.** Состав жирных кислот продукта биоконверсии.  
**Fig. 2.** Composition of fatty acids of bioconversion product.

Среди насыщенных ЖК преобладает пальмитиновая кислота (C16:0), которая наряду со стеариновой кислотой, является конечным продуктом биосинтеза ЖК. Стеариновая кислота (C18:0) синтезируется из пальмитиновой и выполняет функцию источника энергии. Ее содержание в контрольной пробе на 2.3% больше, чем в опытной, в то время как пальмитиновой кислоты в опытной пробе меньше, чем в контрольной.

Из ненасыщенных ЖК в пробах преобладает олеиновая кислота (C18:1). Содержание этой кислоты в опытной и контрольной образцах отличается незначительно и составляет 24.4 и 24.9%, соответственно (рис. 2).

Стоит отметить присутствие в составе жировой фракции двух кислот с нечетным количеством атомов – пентадекановая (C15) и маргаритовая (C17). Их суммарное содержание в обеих пробах состав-

вило около 3% от суммы идентифицированных соединений. Низкомолекулярные компоненты с числом атомов углерода 4–13 были обнаружены в следовых количествах, причем в контрольном образце их содержание было выше, чем в опытном в 1.6 раз.

Среди мононенасыщенных ЖК идентифицированы миристолеиновая (С14:1), пальмитолеиновая (С16:1) и олеиновая кислоты (С18:1). Суммарное их содержание в жировой фракции, полученной при культивировании в предварительно обработанной УЗ среде выше, чем в среде без обработки – 26.8 и 34.7%, соответственно

Промежуточным звеном в биосинтезе олеиновой кислоты является пальмитолеиновая кислота. При этом стоит отметить, что содержание олеиновой кислоты в опытном и в контрольном образце практически идентично, хотя содержание пальмитолеиновой кислоты в опытном выше, чем в контрольном в 4 раза.

Из ПНЖК была идентифицирована линолевая кислота (С18:2). Известно [17], что она, как и  $\alpha$ -линоленовая кислота, является эссенциальной и незаменимой для млекопитающих, в связи с отсутствием необходимых для их синтеза десатураз. В опытном образце содержание этой кислоты на 6% больше, чем в контрольном (11.6 и 17.3%).

Таким образом, в результате исследования ЖК состава липидов продукта биоконверсии опилок грибом рода *T. pubescens* было идентифицировано 14 соединений с числом атомов углерода от 4 до 18. При сравнительном анализе проб установлено что применение УЗ воздействия при подготовке среды для культивирования оказывает положительное влияние на последующий процесс биоконверсии, значительно увеличивая содержание ПНЖК в составе жировой фракции. Исходя из полученных результатов, можно заключить, что продукт, полученный с применением предварительной УЗ обработки среды характеризуется большей питательной ценностью.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы приносят благодарность за содействие и поддержку выполнения работы директору НИИ биологии “ИГУ” д.б.н., проф. М.А. Тимофееву.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено при поддержке проекта государственного задания № FZZE-2020-0026.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Минаков Д.В., Севодина К.В., Шадринцева А.И. и др. Сравнительная оценка аминокислотного и белкового составов мицелия и плодовых тел некоторых базидиомицетов. *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*, 2016, 6(3), 50–56.
2. Краснопольская Л.М., Шуктуева М.И., Автономова А.В. Противоопухолевые и антиоксидантные свойства водорастворимых полисахаридов из мицелия базидиального гриба *Flammulina velutipes*. *Антибиотики и химиотерапия*, 2016, 61(11–12), 16–20.
3. Montoya S., Orrego C., Levin L. Modeling *Grifola frondosa* fungal growth during solid-state fermentation. *Eng. Life Sci.*, 2011, 11, 316–321. <https://doi.org/10.1002/elsc.201000087>
4. Shrivastava B., Nandal P., Sharma A., et al. Solid state bioconversion of wheat straw into digestible and nutritive ruminant feed by *Ganoderma* sp. rckk02. *Bioresour. Technol.*, 2012, 107, 347–351. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.12.096>
5. Ćilerdžić J., Stajić M., Vukojević J. Degradation of wheat straw and oak sawdust by *Ganoderma applanatum*. *Int. Biodeterior. Biodegradation*, 2016, 144, 39–44. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.05.024>
6. Чхенкели В.А. Препараты последнего поколения на основе грибов-ксилотрофов рода *Trametes*: обнаруженные эффекты, механизмы действия и применение. Монография, М.: Изд-во “Перо”, 2014, 256 с.
7. Чхенкели В.А., Юденич С.В., Шкиль Н.А. и др. Препарат траметин для лечения желудочно-кишечных болезней телят и способ его применения. Патент RU 2545986, опублик. 10.04.2015, Бюл. № 10.
8. Чхенкели В.А., Николаева Л.А., Чхенкели Л.Г. Утилизация и детоксикация отходов целлюлозно-бумажной промышленности при твердофазной ферментации продуцента *Trametes pubescens* (Shumach.) Pilat. *Альманах современной науки и образования*, 2009, 5(24), 178–179.
9. Шапкина С.С., Чхенкели В.А., Евстафьев С.Н. Биоконверсия опилок базидиальным грибом рода *Trametes*. Актуальные проблемы химии, биотехнологии и сферы услуг. Сборник трудов конференции. Иркутск, 2021, 66–70.
10. Тарнопольская В.В., Рязанова Т.В., Демиденко Н.Ю., Ерёмченко О.Н. Технология микробиологической переработки растительного сырья культурами *Pleurotus* с получением кормовых продуктов. *Химия растительного сырья*, 2020, 4, 405–414.
11. Wei-Chien Tu, Jason P. Hallett Recent advances in the pretreatment of lignocellulosic biomass. *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.*, 2019, 20, 11–17. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2019.07.004>
12. Kardos N., Luche J.L. Sonochemistry of carbohydrate compounds. *Carbohydr. Res.*, 2001, 332, 115–131. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(01\)00081-7](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(01)00081-7)
13. Меледина Т.В., Иванова В.А., Федоров А.В. Аппаратурно-методическая база экспериментов в области пищевой биотехнологии продуктов из растительного сырья. Учебное пособие. – Санкт-Петербург: Университет ИТМО, 2017, 60 с.
14. ГОСТ 31663-2012. Определение методом газовой хроматографии массовой доли метиловых эфиров жирных кислот. Введен Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии 2014-01-01.

15. Эльпинер И.Е. Биофизика ультразвука. М.: Наука, 1973, 384 с.
16. Чхенкели В.А. Стимуляция биосинтеза лизина синтетическими углеводами. Дис. ... канд. тех. наук ЛТИ им. Ленсовета. Л., 1986, 136 с.
17. Tarnopol'skaya V.V., Kiseleva O.V., Alaudinova E.V., et al. Fatty Acids of Xylotrophic Basidiomycetes of the Genus *Pleurotus* in Submerged Culture. *Chem. Nat. Compd.*, 2015, 51, 328–329.  
<https://doi.org/10.1007/s10600-015-1272-1>

## Effect of Ultrasonic Pretreatment of Nutrient Medium on the Yield and Composition of Fatty Acids in the Bioconversion Product

V. A. Chkhenkeli<sup>a</sup>, S. S. Shashkina<sup>b,\*</sup>, T. N. Malova<sup>c</sup>, and S. N. Evstaf'ev<sup>b</sup>

<sup>a</sup>*Institute of Biology, Irkutsk State University, Irkutsk, 664003, Russia*

<sup>b</sup>*Irkutsk National Research Technical University, Irkutsk, 664074, Russia*

<sup>c</sup>*Irkutsk Interregional Veterinary Laboratory, Irkutsk, 664005, Russia*

\*e-mail: [chiffa19@mail.ru](mailto:chiffa19@mail.ru)

**Abstract**—The article describes the conditions selected for the ultrasound pretreatment of a liquid nutrient medium for the preparation of an inoculum of the *Trametes* genus fungus. It was established that the application of ultrasound with a frequency of 40 kHz had a significant effect on the qualitative and quantitative composition of fatty acids (FA) in the product of bioconversion of lignocellulosic substrate by fungi of the *Trametes* genus. It was shown that the content of unsaturated FA in the lipid fraction of the bioconversion product obtained with the use of ultrasound was higher than in the untreated control sample, which indicates a higher nutritional value of the product obtained according to the developed protocol.

**Keywords:** fatty acids, basidiomycete, xylotroph, ultrasound treatment, sawdust, solid-state cultivation